



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06098650 A**(43) Date of publication of application: **12.04.94**

(51) Int. Cl

A01H 4/00(21) Application number: **04275502**(22) Date of filing: **19.09.92**(71) Applicant: **TAIYO KAGAKU CO LTD**(72) Inventor: **SHU SEJI
KIN BUSAKU
YAMAMOTO TAKEHIKO**

(54) **METHOD FOR CARRYING OUT LARGE-SCALE
PROLIFERATION BY TISSUE CULTURE OF
ALLIUM VICTORIALIS L.**

(57) Abstract:

PURPOSE: To proliferate young seedlings of *Allium victorialis* L. in large quantities by using a technique of plant tissue culture.

CONSTITUTION: A section of rhizome base of *Allium victorialis* L. is cultured in a medium containing a plant hormone to induce an adventitious bud. The

adventitious bud is transplanted and proliferated in large amount and subjected to auxetic growth and further transplanted to a medium for rooting to rear a perfect young plant. The young plant is acclimated and then subjected to potting so that the young plant may be supplied as a seedling for transplantation. Although *Allium victorialis* L. has very low rate of multiplication under natural conditions, a large amount of seedlings can annually and continuously be produced and fed by this method.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-98650

(43)公開日 平成6年(1994)4月12日

(51)Int.Cl.⁵

A 0 1 H 4/00

識別記号

庁内整理番号

8502-2B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数3(全 5 頁)

(21)出願番号 特願平4-275502

(22)出願日 平成4年(1992)9月19日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年4月1日～
4月3日 日本育種学会開催の「日本育種学会 第81回
講演会」において文書をもって発表

(71)出願人 000204181

太陽化学株式会社

三重県四日市市赤堀新町9番5号

(72)発明者 朱 政治

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化
学株式会社内

(72)発明者 金 武祚

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化
学株式会社内

(72)発明者 山本 武彦

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化
学株式会社内

(54)【発明の名称】 ギョウジャニンニクの組織培養による大量増殖法

(57)【要約】

【目的】 植物組織培養の手法を用いて、ギョウジャニンニクの幼苗を大量に増殖する。

【構成】 ギョウジャニンニクの根茎基部切片を植物ホルモンを含む培地で培養し、不定芽を誘導する。不定芽を移植して大量に増殖、肥大成長させた後、さらに発根用培地へ移植し完全な幼植物を育成する。幼植物は馴化させた後、鉢上げして移植用苗として供給できる。

【効果】 ギョウジャニンニクは自然条件下では増殖率が非常に低いが、本発明の方法により周年的かつ連続的に大量の苗を生産、供給することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ギョウジャニンニクの根茎基部を分割し、MS (Murashige and Skoog) 培地又はMS改変培地上で培養して複数の不定芽を誘導させ、それらをさらに増殖させた後、発根用培地上で発根を促進させて幼植物体を大量に得ることを特徴とする組織培養法。

【請求項2】 組織培養法において不定芽の誘導と増殖促進の各段階にオーキシンとしてナフタレン酢酸 (NAA) を0.1~0.3mg/l、サイトカイニンとしてベンジルアデニン (BA) を1.0~5.0mg/lの範囲で組み合わせた培養培地を使用することを特徴とする請求項1記載の組織培養法。

【請求項3】 請求項2記載の組織培養法において得られたシュート (苗条) をMS培地の主要塩類を2分の1に減じ、オーキシンとしてインドール酪酸 (IBA) を0.5~2.0mg/l添加した培地上で培養することにより速やかに発根を促進させ、完全な幼植物体を得ることを特徴とする組織培養法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、組織培養法を利用したギョウジャニンニクの大量増殖法の確立に関するもので、これにより苗の周年供給およびギョウジャニンニクの安定的大量生産を可能とする。

【0002】

【従来の技術】 ギョウジャニンニクは北海道から本州北部にかけて自生するユリ科ネギ属の多年草で、これらの地方では古くから郷土色豊かな山菜として食用に供されてきた。更に、ギョウジャニンニクはアリチアミン効果による疲労回復やコレステロール抑制作用、抗血栓作用などの薬理効果を持つことから健康食品、機能的食品用の素材として種々の形で加工利用されている。近年の自然食品ブームとも相まってギョウジャニンニクに対する需要は飛躍的に高まっているが、供給源はもっぱら山野に自生する個体の採集に依存しており、また自然環境下では生育が極めて遅く栽培法も確立されていないため資源の枯渇が懸念されている。

【0003】 ギョウジャニンニクを組織培養により増殖しようという試みは、根から不時出芽する不定芽を利用する方法 (園芸学雑誌60巻別冊2、P232-233、1991) や生長点の培養による増殖法に関する報

告がある (北海道立工業試験場報告、1-24、1988及び特開平3-247217)。しかし、いずれも増殖率は種子繁殖と比較して飛躍的な増大とは言い難い。本発明による方法はこれらの報告と比較して操作がより簡便である上、はるかに高い増殖率が得られることを特徴とする。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は植物組織培養の手法を用いてギョウジャニンニクの幼苗を大量に増殖させるための最適条件を確立することであり、それによって大きな需要に対応することができ、ひいては天然資源の保護にも貢献できる。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明はユリ科ネギ属植物であるギョウジャニンニクの鱗茎基部を植物ホルモンを含む培養培地上で培養して不定芽を誘導し、それをさらに増殖、肥大させた後発根させる過程より成る幼苗の連続的大量増殖法である。

【0006】 1. 培養に供する植物体の部位

組織培養法を植物の増殖のための手段として適用する場合、若い葉、茎、鱗茎部、生長点や根部など種々の組織を使ってカルスや不定芽、不定胚を誘導させる方法が考えられる。一般に植物の組織培養により増殖を行なう場合、植物の種により最適部位は異なることが知られており、一義的に定まるものではなく、部位の選択が重要である。予備実験の結果、本発明のギョウジャニンニクの場合は茎盤部を含む根茎基部を培養し不定芽を誘導させる方法が最も効率が良いことが明らかになった。しかも、本発明において使用される根茎部は生長点を含むごく限られた小切片である必要はなく、外側の包葉を剥いて残る直径1cm前後の部分すべてを分割して培養に供試できるので、従来の方法に比べ格段に大量の不定芽を一度に誘導することが可能である。

【0007】 2. 不定芽の誘導

不定芽を誘導させるための培地はMS培地又はMS培地の無機塩類にB5培地の有機成分を加えたMS改変培地が使用できる。本願発明におけるMS改変培地は表1に示す組成のものである。

【0008】

【表1】

3
MS改変培地の組成 (mg/liter)

無機塩類 (MS培地より)		有機成分 (B5培地より)	
主要塩類		Myo-inositol	100
KNO ₃	1.900	Nicotinic acid	1
NH ₄ NO ₃	1.650	Pyridoxine-HCl	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	Thiamine-HCl	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440		
KH ₂ PO ₄	170		
鉄成分			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8		
Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	37.3		
微量成分			
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3		
H ₃ BO ₃	6.2		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6		
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025		
KI	0.8		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025		

【0009】上記培地に添加する植物ホルモンは、オーキシン類としては、ナフタレン酢酸 (NAA)、サイトカイニン類としてはベンジルアデニン (BA) を組み合わせて添加することにより効果的に不定芽を誘導することができる。従来、オーキシンとしてはNAAの他に2, 4ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D)、サイトカイニンとしてはBAの他にカイネチンを用いることが知られているが、予備実験の結果、NAAとBAの組み合わせが最も好ましいことが明らかになった。さらに、NAA濃度は0.1~0.3mg/l、BA濃度は1.0~5.0mg/lとするのが好ましい。また、カザミノ酸を100~500mg/l添加すると更に効率が良くなる。

【0010】3. 不定芽の増殖

最初に誘導された不定芽の集合体 (多芽体) は分割して増殖培地に移植を繰り返すことにより急速にかつ連続的に不定芽を増殖させることができる。培地は上記と同様で良く、植物ホルモンはオーキシン濃度を0.1~0.2mg/lに、サイトカイニン濃度は1.0~3.0mg/l

g/lの範囲で使用するのが好ましい。

【0011】4. 不定芽の成長と発根の促進

増殖した不定芽はサイトカイニンの濃度で0.1~0.5mg/lに下げた培地に移植することにより、増殖率は低下する代わりに個々の個体は肥大成長が顕著になり、一部では発根が観察される場合もある。MS培地成分の内、主要塩類を2分の1に減らし、植物ホルモンとしてインドール酪酸 (IBA) を0.5~2.0mg/l添加した培地上で培養すると活発に発根し始め、完全な幼植物体を得ることができる。

【0012】5. 馴化と鉢上げ

発根促進培地上で旺盛な発根が認められかつ茎葉部が3cm以上に成長した幼植物体は根に付着した寒天を完全に洗い落としてからバーミキュライトを入れた容器に植え込み、透明フィルムなどで覆って水分の蒸発を防ぎながら2~4週間、18~25℃、光量500~2,000Lux、16時間日長下で育てると植物体全体が外部環境に耐えられる丈夫さになる。これら幼植物を培養土の入った鉢や育苗バットに移植して温室内で1カ月以上育て

ることにより戸外の土壌へ移植可能な健全なギョウジャニンニク苗を大量に生産することが可能である。

【0013】

【実施例】ギョウジャニンニク植物体を流水中でよく洗浄し、1,000倍希釈した市販漂白剤溶液の中で伸長葉と根を取り除く。クリーンベンチ内で緑色の莖葉部分と根の着生部分をメスで切除し白色の鱗茎部を取り出す。この鱗茎部を最初70%エタノール溶液に20~30秒間、次いで20%次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度1%）に5~20分間浸漬した後、滅菌水で3回洗った。次亜塩素酸ナトリウム溶液への浸漬時間は5分間でも十分と考えられるが、ごくまれに雑菌の混入が認められた場合があるのでなるべくそれ以上の時間処理したほうが良いと考えられる。20分間以上の処理はかえって鱗茎部が葉害を受けるので避けたほうが良い。ただし、次亜塩素酸ナトリウム溶液の濃度を低くして浸漬時間を長くすることは可能である。

【0014】消毒した根茎基部は莖盤を含む部分を0.5~1cmの厚さに横断し、さらにそれを8~10個に縦断分割して不定芽を誘導するための培地に移植した。不定芽誘導にはMS培地の無機塩類にB5培地の有機成分を加えたものを基本培地とし、カザミノ酸500mg/l、オーキシンとしてNAAを0.1~0.3mg/l、サイトカイニンとしてBAを0~5.0mg/l、蔗糖を30g/lを添加した。pHを5.8に調整し、0.8%の寒天を加えてオートクレーブ滅菌した後、クリーンベンチ内であらかじめ滅菌しておいた培養容器に*

*分注した。BA濃度を1.0mg/lに固定したときのNAA濃度の効果については表2に示したように、0.1~0.3mg/l区が最も良い成績が得られた。

【0015】

【表2】

NAA濃度 (mg/l)	不定芽の形成程度
0	±
0.1	+++
0.2	++
0.3	++
0.5	±

± : 普通

++ : 良好

+++ : 優良

【0016】培養開始後6週間目に不定芽の形成を観察した結果を表3に示した。（NAAは0.1mg/l添加の場合）

【0017】

【表3】

BA濃度 (mg/ l)	使用した 移植片数	不 定 芽 の 形 成			根 の 形 成	
		無 し	1 ～ 3 個	4 個以上	無 し	発 根
0	12	10(83)	2 (17)	0 (0)	4 (33)	8 (67)
0.2	18	3 (17)	15(83)	0 (0)	3 (17)	15 (83)
0.5	18	4 (22)	11(61)	0 (17)	8 (44)	10 (56)
1.0	17	2 (12)	10(59)	5 (29)	14 (82)	3 (18)
2.0	20	2 (10)	10(50)	8 (40)	15 (75)	5 (25)
5.0	17	2 (12)	8 (47)	7 (41)	15 (88)	2 (12)

() 内の数字は移植片数を100とした際のパーセントを示す。

【0018】表3の結果から、BAの濃度が1.0mg/l以上で不定芽形成率が明らかに高くなり5.0mg/lまでその効果が認められた。オーキシンはNAA以外、例えば2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）を使用した場合不定芽の形成率は2~4割ほど低下したことから、NAAとBAの組み合わせが最も適していると考えられた。カザミノ酸の添加は不定芽の誘導と肥大成長に補足的な役割を果たしているように思われた。

【0019】成長した不定芽の集合体を分割し、MS培地またはMS改変培地にNAA0.1mg/l、BA2.0mg/lを添加した培地上で継代培養すると6週間毎に2倍以上の増殖率が得られた。継代培養におけるBA濃度の影響についての結果を表4に示す。表中の数値はそれぞれ10回の反復実験の平均値である。

【0020】

【表4】

BA濃度 (mg/l)	新しく形成された不定芽の長さと数		
	5mm以下	5~10mm	10mm以上
0.3	3.1	5.3	5.8
2.0	10.4	6.4	1.3

【0021】表4から明らかなように、BAの濃度は不定芽の形成と肥大成長に大きな影響を持ち、低濃度では新しい不定芽の誘導を抑え、既に形成されている不定芽を成長させる。高濃度では逆に不定芽の成長はそれほど目立たないが、新しい不定芽の活発な誘導が認められた。従って、不定芽を増殖する目的のためには1.0~3.0mg/lのBA濃度を、発根培地に移植する前に*

*個体の発育を促すためには0.1~0.5mg/lの範囲の濃度を用いると良い。

【0022】不定芽が3cmほどに成長したら1~2本ずつ切り離して発根促進用培地へ移植する。BAの濃度を低くするか無添加にしてもある程度の発根は認められたが、本数、長さおよび太さのいずれも馴化できるまで育てるのに長期間の培養が必要であった。そこで、培地成分と、BA以外の植物ホルモンの効果について調べた。その結果、培地成分としてはMS培地成分の主要塩類を2分の1に希釈した培地が、また、植物ホルモンの種類ではIBAが特異的に発根促進に効果を持つことが明らかになった。表5にIBAの濃度と発根促進効果の関係を示した。各区とも20反復の平均値で表示した。

【0023】

【表5】

I B A 濃 度 (mg / l)	発 根 の 状 態					
	1 本 の 不 定 芽 を 移 植 し た 場 合			2 ～ 3 本 を ま と め て 移 植 し た 場 合		
	良 い	普 通	悪 い	良 い	普 通	悪 い
0	4	13	9	2	8	10
0. 1	6	7	7	—	—	—
0. 5	9	7	4	12	4	4
1. 0	10	5	5	11	5	4
2. 0	—	—	—	14	4	2

良い；長さが20mm以上の太い根が5本以上発生したのが認められた場合

普通；10~20mmの根が5本以上発生したのが認められた場合

悪い；発根が認められないか10mm以下の根が2、3本までしか見られなかった場合

【0024】表5の結果から0.5~2.0mg/lの範囲においてIBAの添加は活発な発根を促進させる作用を有することが推察された。また、MS培地にIBAを添加しても「普通」~「悪い」の評価しか得られなかったことから、MS培地成分のうち無機塩類を2分の1に減らすことも発根を促進するうえで重要な要因であることが明らかとなった。

【0025】

【発明の効果】本発明の方法によれば、1本の親植物から1年間でフラスコ苗であれば1000本以上、馴化、鉢上げした成苗でも250本以上の大量増殖が可能である。このようにして誘導、増殖した多数の不定芽を発根させて馴化、鉢上げすれば、周年的にかつ連続的に大量のギョウジャニンニク苗を生産供給することができる。